

На правах рукописи



Черепович Богдан Сергеевич

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ПОСТИНФЕКЦИОННОГО И ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО
ИММУНИТЕТА ПРОТИВ SARS-COV-2**

3.2.7. Иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
академик РАН

Свитич Оксана Анатольевна

Официальные оппоненты:

Исакова-Сивак Ирина Николаевна - доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», заместитель директора по научной работе

Зурочка Александр Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», лаборатория иммунопатофизиологии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

Защита состоится « 16 » декабря 2025 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.173.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5А

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова и на сайте <https://instmech.ru/ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Мурзина Алёна Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, стала одним из наиболее значимых глобальных вызовов XXI века, оказав существенное влияние на систему здравоохранения, экономику и социальную сферу. Несмотря на успехи в разработке вакцин и методов лечения, вирус продолжает эволюционировать, что приводит к появлению новых вариантов, обладающих повышенной контагиозностью и устойчивостью к существующим мерам защиты [Harvey et al., 2021]. В данных условиях понимание механизмов развития и функционирования иммунного ответа — как естественного (постинфекционного), так и индуцированного вакцинацией (поствакцинального) — приобретает особую значимость. Это знание является основой для разработки эффективных стратегий профилактики и контроля инфекции.

Особую важность приобретает комплексная оценка постинфекционного и поствакцинального иммунитета против SARS-CoV-2, поскольку данные исследований неоднозначны и не соответствуют каноническим представлениям о длительности и эффективности защиты. На сегодняшний день известно, что иммунный ответ на вирус включает как клеточные, так и гуморальные компоненты, каждый из которых играет свою роль в защите организма [Sette et al., 2021]. Однако характер и продолжительность этого ответа могут значительно варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как возраст пациента, наличие сопутствующих заболеваний, тяжесть перенесенной инфекции, тип вакцины и время, прошедшее после вакцинации или заболевания [Collier et al., 2021].

Кроме того, появление новых штаммов SARS-CoV-2 ставит под сомнение эффективность существующего иммунитета, таких как антитела и Т-клетки, выработанные после контакта с исходным штаммом или вакцинами на его основе, могут быть недостаточно эффективными против новых вариантов вируса [Cao et al., 2022]. Это требует постоянного мониторинга изменений в иммунологическом профиле населения и адаптации вакцинных платформ.

Понимание динамики иммунного ответа также необходимо для прогнозирования рисков повторных инфекций, оценки необходимости ревакцинации и разработки персонализированных подходов к профилактике и лечению [Proal et al., 2021]. Проведение углубленного анализа данных процессов не только позволит усовершенствовать подходы к медицинскому ведению пациентов, но и создаст основу для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на снижение негативных последствий заболевания.

В связи с вышеизложенным, важным аспектом является разработка и оптимизация систем для комплексного изучения гуморального и клеточного иммунитета — как после перенесенной инфекции, так и после вакцинации. Эти системы позволят всесторонне изучить формирование популяционного иммунитета и послужат основой для разработки будущих стратегий борьбы с COVID-19.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день накоплен значительный объем данных, касающихся механизмов формирования иммунного ответа после перенесенного заболевания COVID-19 и вакцинации. Современные исследования показывают, что после перенесенной инфекции у большинства людей формируется как гуморальный (антителозависимый), так и клеточный иммунитет. Уровень антител к ключевым белкам вируса, таким как S-белок и его рецептор-связывающий домен (RBD), коррелирует с защитой от повторного заражения. Однако продолжительность и стабильность этого иммунитета остаются предметом научных дискуссий. В научной литературе широко представлены данные об уровнях антител IgM, IgG и IgA в сыворотке крови у пациентов с различными формами заболевания, а также их корреляция с тяжестью течения COVID-19 [Xiaowei Li, 2020; Maria Clara Saad Menezes, 2021; Тотолян А.А. и соавт., 2023]. Особенно актуальны вопросы снижения уровня антител со временем и их способности нейтрализовать новые варианты вируса. Однако методологии оценки гуморального иммунитета часто ограничиваются стандартными серологическими тестами, которые фиксируют только наличие антител, но не всегда учитывают их функциональную активность, такую как способность нейтрализовать вирус или взаимодействовать с комплементом.

Что касается клеточного иммунитета, значительные усилия направлены на изучение роли CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в защите от SARS-CoV-2 [Sekine et al., 2020; Tarke et al., 2021, Киселевский М.В. и соавт., 2022]. Тем не менее, существующие методы анализа клеточного иммунитета, такие как ELISpot или внутриклеточное окрашивание цитокинов, требуют стандартизации и унификации для обеспечения воспроизводимости результатов между лабораториями. Кроме того, вопросы долгосрочной персистенции иммунологической памяти, особенно у лиц, перенесших бессимптомное или легкое течение заболевания, остаются недостаточно изученными.

Таким образом, несмотря на значительный прогресс в понимании отдельных компонентов иммунного ответа на SARS-CoV-2, комплексная оценка гуморального и клеточного иммунитета требует усовершенствования современных диагностических методов и стандартизированных подходов. Разработка и внедрение оптимизированных тест систем для оценки адаптивного иммунитета имеют важное значение не только для исследовательских целей, но и для клинической практики, включая мониторинг эффективности вакцин и разработку терапевтических стратегий.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является оценка формирования постинфекционного и поствакцинального адаптивного иммунитета против SARS-CoV-2.

Реализация цели исследования включает в себя решение следующих **задач**:

1. Разработать и апробировать тесты для мониторинга гуморального иммунного ответа при COVID-19.
2. Изучить динамику созревания антител IgG к RBD SARS-CoV-2 у добровольцев с различным типом иммунитета.
3. Для оценки нейтрализующих SARS-CoV-2 антител разработать суррогатный вируснейтрализующий тест.
4. Провести сравнительную оценку метода классической вируснейтрализующей реакции с суррогатным вируснейтрализующим тестом на образцах пациентов с постинфекционным,

поствакцинальным и гибридным иммунитетом против SARS-CoV-2, а также оценить возможность его применения на стадии доклинических испытаний вакцинных препаратов против SARS-CoV-2.

5. Разработать и адаптировать тест для оценки клеточного иммунитета к SARS-CoV-2, основанный на принципе измерения IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими антигенами.

6. Оценить клеточно-опосредованный иммунный ответ против SARS-CoV-2 в группах добровольцев с разным типом иммунитета.

Научная новизна исследования

Впервые в рамках данного исследования было показано, что пациенты с гибридным иммунитетом (перенесенная инфекции и вакцинация) демонстрируют более высокие уровни IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 по сравнению с пациентами, перенесшими только первичную инфекцию. Однако анализ аффинности антител выявил, что в 91,2% случаев их созревание остается неполным, что выражается в недостаточной способности антител эффективно связываться с антигеном. Показано, что авидность антител коррелирует с тяжестью течения повторной инфекции COVID-19. Полученные данные свидетельствуют о важной роли качественных характеристик антител в защите организма от повторного заражения.

Впервые продемонстрирована возможность применения суррогатного вируснейтрализующего теста (sVNT) для оценки протективного гуморального иммунитета на этапе доклинических испытаний вакцинных препаратов против SARS-CoV-2. Предложенный подход позволил провести оценку иммунного ответа на трех видах животных. Разработка данного теста значительно расширяет возможности скрининга и анализа эффективности вакцинных кандидатов.

Впервые было показано, что у трети многократно вакцинированных реконвалесцентов не наблюдается специфического клеточно-опосредованного иммунного ответа к коронавирусу, характеризующегося отсутствием продукции интерферона-гамма после стимуляции Т-лимфоцитов антигенами вируса в цельной крови.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в углублении понимания механизмов формирования и функционирования адаптивного иммунного ответа на SARS-CoV-2. Разработанные тест-системы для качественного определения антител класса G и их авидности позволили получить новые данные о динамике созревания гуморального иммунитета, его зрелости и протективной способности. Показали, что при формировании гуморального иммунитета против SARS-CoV-2 процесс созревания IgG-антител к рецептор-связывающему домену коронавируса остается неполным в большинстве случаев. Полученные данные говорят о важности изучения не только общего количества антител, но и их качественных характеристик. Было установлено, что индекс авидности антител может служить важным маркером для прогнозирования тяжести повторного течения COVID-19.

Разработка суррогатного вируснейтрализующего теста для определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, внесла существенный вклад в методологию оценки нейтрализующего потенциала антител. Полученные данные подтвердили высокую корреляцию между результатами sVNT и классической реакции нейтрализации, что демонстрирует возможность использования альтернативных методов для изучения гуморального иммунитета.

Продemonстрирована универсальность метода и возможность его использования для оценки иммуногенности кандидатов в вакцинные препараты на любых видах животных, а также в клинико-диагностической практике для мониторинга популяционного гуморального иммунитета против SARS-CoV-2. Универсальность метода sVNT также открывает перспективы для его применения при исследовании других вирусных инфекций.

Для изучения напряженности Т-клеточного иммунитета против нового коронавируса был разработан тест определения *in vitro* ответа иммунных клеток крови человека на их стимуляцию антигенами SARS-CoV-2. Разработанный тест может быть использован как для научных исследований, так и специалистами здравоохранения для мониторинга клеточно-опосредованного иммунитета против SARS-CoV-2.

Методология и методы исследования

В исследовании адаптивного иммунитета были использованы образцы сывороток крови, полученные от добровольцев мужского и женского пола старше 18 лет, которые перенесли COVID-19 и/или были вакцинированы препаратом «ГамКовидВак». Также в работе были использованы образцы сывороток крови трех видов животных. Все образцы были охарактеризованы при помощи сбора анамнеза и классических иммунологических и вирусологических методов. По полученным данным, на первом этапе исследования, были сформированы панели образцов для валидации новых иммунологических тестов для оценки формирования как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета. На всех этапах работы применялись различные методы статистической обработки результатов исследований. По результатам работы сформулированы выводы и практические рекомендации.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании экспериментальной части исследования, включая разработку методологии оценки гуморального и клеточного иммунитета против SARS-CoV-2, а также выбор методов анализа. По итогам работы, с участием автора были зарегистрированы два набора реагентов для качественного определения IgG против SARS-CoV-2, также была разработана универсальная тест-система определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, которая является аналогом реакции нейтрализации. Помимо разработанных тестов оценки гуморального иммунитета, автор работы является разработчиком теста, основанного на выявлении клеточно-опосредованного иммунного ответа на SARS-CoV-2 посредством измерения гамма-интерферона, продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими пептидами антигенов SARS-CoV-2. Соискатель принимал личное участие в проведении анализов и интерпретации полученных данных, включая статистическую обработку результатов. Самостоятельно выполнил написание обзорной части работы и глав собственных исследований по полученным результатам. Участвовал в подготовке и представлении результатов исследования на научных конференциях и семинарах. Автором самостоятельно и в соавторстве подготовлены 9 публикаций по теме исследования, включая статьи в рецензируемых журналах и тезисы конференций.

Положения, выносимые на защиту

1. Процесс формирования антител класса IgG, направленных против рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2, в 91,2% случаев характеризуется низкой авидностью, даже спустя значительное время после инфицирования или вакцинации, и не зависит от кратности контакта с антигеном. Исследования, проведенные на пациентах, перенесших инфекцию, вызванную исходным штаммом SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1), показали, что индекс авидности IgG к RBD может служить прогностическим маркером риска тяжелого течения заболевания при повторных инфекциях.

2. Разработана и апробирована тест-система для определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с ACE2-рецептором человека (суррогатный вируснейтрализующий тест). Установлена высокая степень корреляции с классической реакцией нейтрализации при анализе вируснейтрализующих антител у добровольцев с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетом, а также для трех видов животных: собак, трансгенных мышей и коров. Было установлено, что в среднем у 7,4% добровольцев с различным типом иммунитета отсутствовали вируснейтрализующие антитела.

3. Разработан и апробирован тест, основанный на способности Т-клеток людей иммунных к SARS-CoV-2 продуцировать IFN- γ в ответ на их стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 в цельной крови.

4. Оценка клеточно-опосредованного иммунитета к SARS-CoV-2 показала, что у двух третей добровольцев с гибридным иммунитетом (постинфекционным и поствакцинальным) наблюдалась специфическая Т-клеточная реакция. Уровень этой реакции был выше у лиц, ревакцинированных за два месяца до исследования. Взаимосвязи между уровнем антител к рецептор-связывающему домену SARS-CoV-2 и уровнем стимулированного IFN- γ выявлено не было.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Направление диссертационного исследования соответствует п. 2 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии», п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» п. 9 «Разработка и усовершенствование методов оценки качества постинфекционного и поствакцинального иммунитета, эффективности и безопасности новых вакцинных препаратов паспорта специальности» 3.2.7. Иммунология (медицинские науки).

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания (26–29 октября 2021 г., Сочи); Научная конференции с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology», посвященной 300-летию РАН (03–04 июня 2022 г., Москва); Научная конференция молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology», посвященная 300-летию РАН (20–21 апреля 2023 г., Москва); Всероссийская конференции: «COVID-19 – экспертный опыт работы в условиях пандемии и межковидный период. Все о

диагностике, лечении, реабилитации пациентов. Коморбидный пациент — междисциплинарный подход» (10 октября 2023 г., Москва); Научная конференция молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology», посвященная 300-летию РАН (23–24 апреля 2024 г., Москва).

Апробация материалов диссертационного исследования проведена на конференции отдела иммунологии и аллергологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Протокол №2 от 28.04.2025 г.). Обоснованность и достоверность выводов обеспечивается за счет продуманного выбора лабораторных методик и корректного использования методов статистической обработки данных. Выводы, сделанные в ходе исследования, соответствуют его целям и задачам, а также полностью подтверждаются результатами выполненной работы.

Публикации по теме диссертации

Результаты печатной работы представлены в 9 печатных работах, в том числе в 5 статьях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed и включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России и 4 публикациях в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 157 страницах текста, содержит 13 таблиц, 35 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, применение результатов и научных выводов, список цитируемой литературы. Библиографический указатель включает 239 наименований, из них 11 отечественных и 228 иностранных источника.

Благодарности

Считаю своим долгом выразить глубокую и искреннюю благодарность заведующей лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова Борисовой Ольге Васильевне за ценные научные рекомендации, профессиональное наставничество и неизменную поддержку на всех этапах подготовки диссертационной работы. Я также чрезвычайно признателен за доверие и возможность профессионального роста, которые позволили мне завершить данное исследование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Для изучения гуморального и клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2 были использованы образцы сыворотки крови и цельной крови добровольцев обоих полов старше 18 лет полученные в период 2017–2023 годов с различным анамнезом по отношению к COVID-19 (n=600). Серологические образцы были любезно предоставлены ООО «МедипалТех», а также получены на базе консультативно-диагностического центра ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова.

Исследование также включало использование сывороток крови животных для оценки

гуморального иммунного ответа, вызванного иммунизацией экспериментальной вакциной против SARS-CoV-2. В работе было исследовано 37 сывороток крови животных (8 коров, 10 собак, 19 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn, самки и самцы (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)), иммунизированных кандидатным вакцинным препаратом против COVID-19 (предоставлены ООО «Фирн М»), содержащими белок Spike SARS-CoV-2. Для собак и коров анализируемые парные образцы получены от животных до и после иммунизации. В случае трансгенных мышей в эксперименте участвовали две группы животных – контрольная группа и группа вакцинированных животных. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных. Исследование одобрено на заседании Локального совета по этике ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Протокол № 8 от 19.10.2021 г.).

Настоящее диссертационное исследование было проведено на базе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова в период с 2021 г. по 2023 г. Работа носила комплексный многоэтапный характер с применением иммунологических, вирусологических и статистических методов исследования. Для определения антител IgG к RBD Spike SARS-CoV-2 был разработан и зарегистрирован «Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека» (Набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» по ТУ 21.20.23-004-28597318-2020, Россия, ООО «МедипалТех»). В качестве набора сравнения при создании набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» был использован набор реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-БЕСТ», Россия, № РЗН 2022/17065). Для выявления IgG к нуклеокапсидному белку (NC) SARS-CoV-2 производилась модификация набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» с заменой иммуносорбента на рекомбинантный N-белок коронавируса (ООО «Хайтест», Россия). После появления международного стандартного образца ВОЗ (NIBSC code: 20/136), результаты выражались в BAU/мл. При оценке содержания антител IgG к RBD у иммунизированных кандидатным вакцинным препаратом животных использовалась модификация набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» с заменой антивидового конъюгата, в зависимости от вида животного.

Для определения индекса avidности (ИА) IgG к RBD SARS-CoV-2 был разработан и зарегистрирован набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс» (ООО «МедипалТех», Россия, РУ № РЗН 2021/14424 от 27.05.2021 г.).

Исследование вируснейтрализующих антител (ВНА) было проведено при помощи реакции нейтрализации вируса в культуре. Использовали лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2 «Dubrovka» (GenBank: MW514307.1). Культивирование вируса проводили на клетках Vero CCL81 (ATCC). Титр вируса SARS-CoV-2 определяли по конечной точке проявления цитопатического действия в культуре клеток Vero. Титр вируса рассчитывали по методике [Ramakrishnan M.A., 2016] и выражали в lg ТЦД₅₀/мл. Определение титра ВНА к SARS-CoV-2 проводили, как описано в работе [Gao Q., 2020], с модификациями.

Для определения нейтрализующих антител (IgG) к рецептор-связывающему домену был разработан и апробирован суррогатный вируснейтрализующий тест, основанный на блокировке взаимодействия RBD SARS-CoV-2 и ACE2 человека в сыворотке или плазме крови. В качестве наборов сравнения при разработке sVNT были использованы «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» («МедипалТех», Россия) и «SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit» («Abbott», Ирландия).

Для оценки клеточного иммунитета, сформировавшегося к SARS-CoV-2, был разработан тест ИГПА (IGRA-Interferon Gamma Release Assay), основанный на способности Т-клеток иммунных к SARS-CoV-2 людей продуцировать IFN- γ , который является одним из маркеров Т-клеточного иммунитета, в ответ на их стимуляцию пептидным пулом в цельной крови.

Анализ полученных данных проводился в программах Microsoft Excel, 2019 (Microsoft, США), GraphPad ver.10 (GraphPad Software Inc., США). Для оценки корреляции между количественными характеристиками, полученными разными методами, использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (доверительный интервал оценивали при $p < 0,05$). Для определения статистической значимости различий между двумя группами данных применялся непараметрический критерий U-критерий Манна-Уитни при $p < 0,05$. Оценка чувствительности и специфичности в разработанных в данной работе тестах осуществлялась при помощи ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic). Для оценки индекса avidности, Δ IFN- γ и концентрации антител к RBD SARS-CoV-2 были созданы графические представления в виде комбинированных box/violin-диаграмм. Эти диаграммы позволяют визуализировать распределение числовых данных по группам с использованием квартильного метода. В данной интерпретации данные представлены через межквартильный размах (Q1-Q3), при этом медиана отображается линией внутри диаграммы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе разработан комплексный подход к изучению адаптивного иммунитета к SARS-CoV-2 в группах добровольцев с разным типом иммунитета.

Сформированный подход включал разработку тестов для оценки гуморального и клеточного иммунитета и их апробацию на клинических образцах добровольцев, перенесших COVID-19 и/или вакцинированных препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Для оценки гуморального иммунитета были разработаны тесты, позволяющие оценить не только общий уровень антител IgG к RBD, но и их качественные характеристики – avidность антител и их нейтрализующую активность, т.е. способность блокировать взаимодействие между RBD SARS-CoV-2 и рецептором ACE2. Для оценки клеточного иммунитета был разработан ИГПА-тест, основанный на способности Т-клеток иммунных к SARS-CoV-2 людей продуцировать IFN- γ , который является одним из маркеров Т-клеточного иммунитета, в ответ на их стимуляцию пептидным пулом в цельной крови.

Разработка методики определения антител класса G к антигенам SARS-CoV-2

Первоочередной задачей исследования явилась разработка системы на основе ИФА для определения антител IgG к RBD SARS-CoV-2. Для разделения добровольцев по типу иммунитета (постинфекционный, поствакцинальный и гибридный) использовали разработанный набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» и его модернизацию, которая заключалась в замене иммуносорбента RBD на рекомбинантный N-белок коронавируса. Отнесение добровольцев к группе "вакцинированные", которые были иммунизированы препаратом «Гам-КОВИД-Вак», проводилось на основании проверки наличия антител IgG к RBD коронавируса и отсутствия антител к N-белку вируса SARS-CoV-2, что свидетельствовало об отсутствии COVID-19 в анамнезе.

Для определения антител к RBD SARS-CoV-2 у различных видов животных, на этапе

доклинических испытаний экспериментального вакцинного препарата против COVID-19, в составе которого содержался белок Spike SARS-CoV-2, использовали набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» с заменой конъюгата на антивидовой.

Изучение avidности IgG антител к RBD SARS-CoV-2 в группах вакцинированных и переболевших добровольцев

Авидность антител отражает качественный аспект иммунного ответа. Для оценки avidности антител IgG к RBD был разработан «Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их avidности в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс» по ТУ 21.20.23-006-28597318-2020. Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14424 от 27.05.2021 г.»

В качестве искомого критерия avidности антител использовался индекс avidности, представляющий собой долю IgG (%), которые могут оставаться в комплексе с RBD в присутствии денатурирующего агента, в общем пуле специфических IgG. С помощью разработанной тест системы на образцах сывороток крови добровольцев, однократно переболевших COVID-19 на первом этапе пандемии (2020 год), было показано увеличение индекса avidности (Рисунок 1) в зависимости от срока после реконвалесценции ($r=0,7262$, $p<0,0001$).

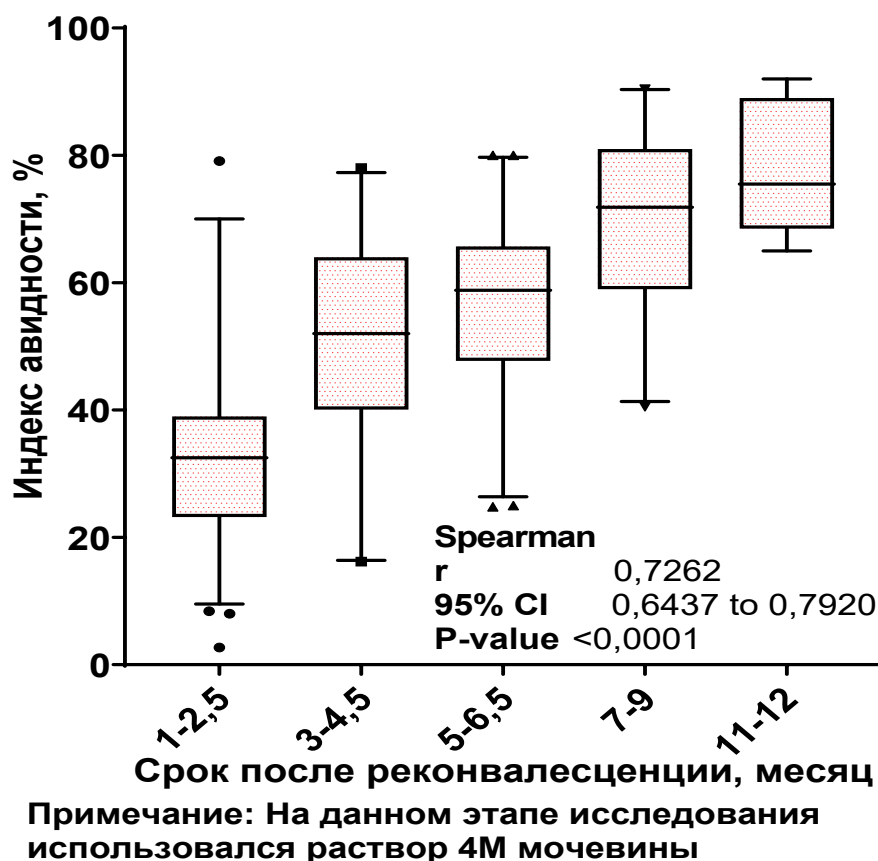


Рисунок 1 – Динамика показателя индекс avidности в зависимости от времени, прошедшего после реконвалесценции

Исследование зависимости тяжести повторной COVID-19 с авидностью IgG антител к RBD SARS-CoV-2

При исследовании индекса авидности у пациентов, повторно перенесших COVID-19 в разной форме, показано, что в случае легкого повторного течения COVID-19 медианный показатель "индекса авидности" был выше чем в группе с повторным тяжелым течением инфекции (81,4% против 28,4 %, Рисунок 2А), различия достоверны ($p < 0,001$).

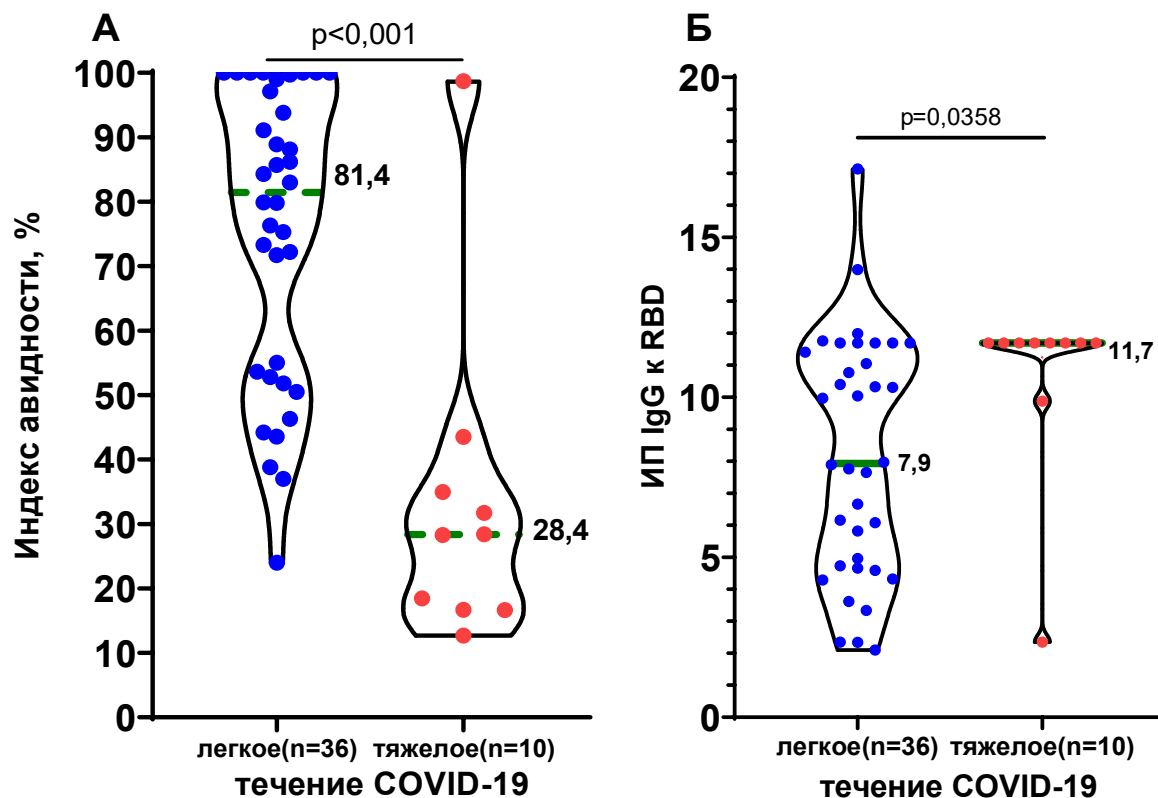


Рисунок 2 – Разница индекса авидности (А) и уровня антител к RBD SARS-CoV-2 (Б) в группах реинфицированных пациентов с легким и тяжелым течением COVID-19

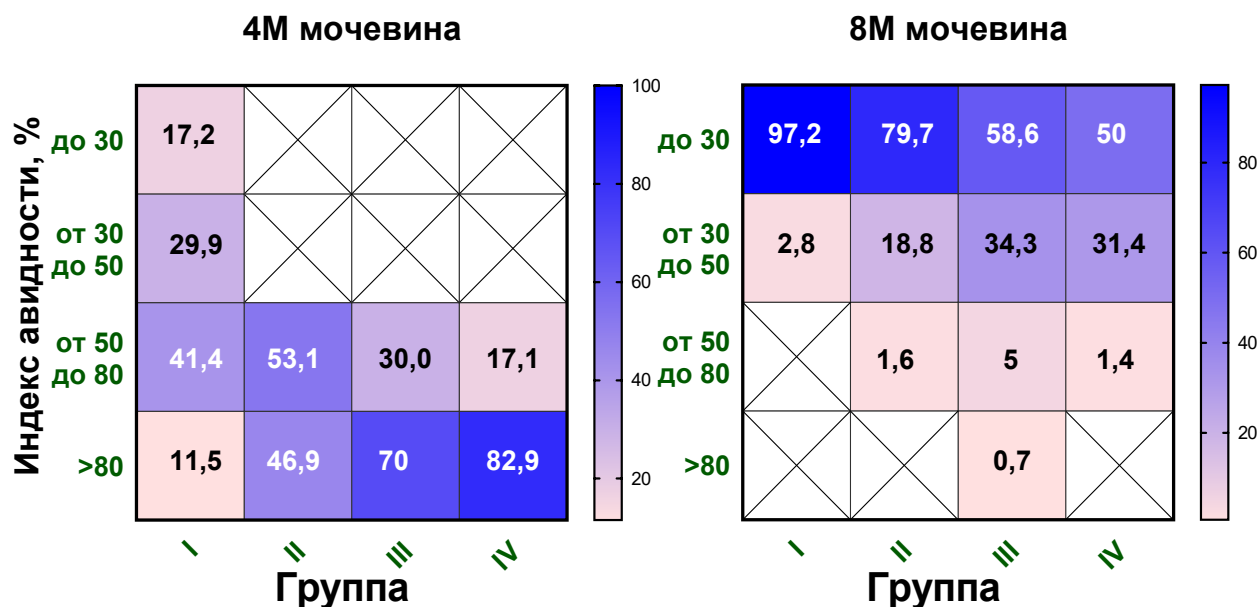
Важно отметить, что при изучении уровня антител IgG к RBD вируса SARS-CoV-2 было показано, что в группе перенесших реинфекцию в тяжелой форме медианный показатель индекса позитивности был достоверно выше, чем в группе с легким течением (11,7 против 7,9; Рисунок 2Б).

Оценка степени созревания антител класса G к RBD SARS-CoV-2 в зависимости от пути и кратности иммунизации

На более поздних этапах пандемии COVID-19 (2022г.), когда значительная часть населения уже перенесла инфекцию и/или была вакцинирована, особую актуальность приобретает изучение качества формируемого гуморального иммунного ответа. Важнейшим показателем, отражающим протективность и зрелость иммунного ответа, выступает степень созревания антител класса G к рецептор-связывающему домену SARS-CoV-2. В этой связи особую значимость приобретает исследование отличий в степени созревания антител класса G к RBD коронавируса с учетом способа и частоты иммунизации/реинфекции.

На данном этапе исследования были сформированы группы образцов сывороток крови добровольцев с разным типом иммунитета, которые были собраны с 2020г. по 2022г. В исследование были включены добровольцы, перенесшие COVID-19 и/или вакцинированные.

В случае SARS-CoV-2 использование 4М мочевины на начальных этапах пандемии (2020-2021гг) оказалось наиболее эффективным для оценки динамики нарастания ИА антител во времени. Для образцов, полученных в более поздний период пандемии, 8М мочевины была использована для оценки степени созревания антительного ответа.



Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше % количества добровольцев, тем насыщеннее градиент цвета
 I.COVID-19(2020); II.Вакцинация(2021); III.COVID-19+вакцинация(2021);
 IV.COVID-19+ревакцинация(2022)

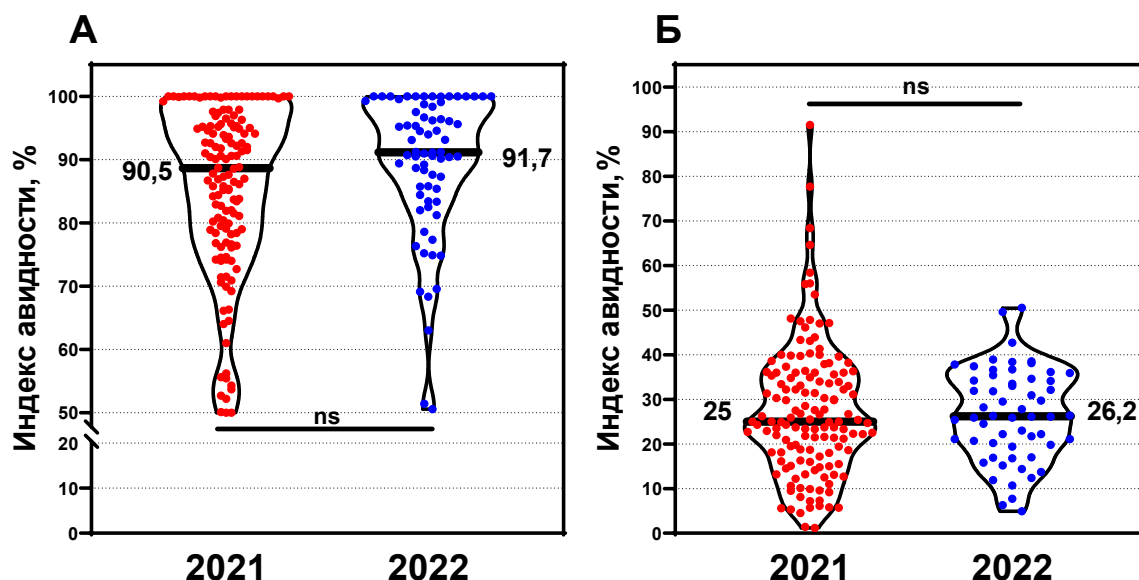
Рисунок 3 – Оценка индекса avidности антител, в присутствии денатурирующего раствора разной концентрации, в образцах сывороток крови добровольцев, с разным типом иммунитета полученных на разных этапах пандемии (2020-2022гг.)

Из данных ИА антител, полученных при использовании 4М мочевины (Рисунок 3), видно, что количество образцов с ИА>80% демонстрирует четкую тенденцию к нарастанию и составляет в группах I – IV, соответственно, 11,5%, 46,9%, 70% и 82,9%. В группе II, III и IV добровольцев с ИА менее 50% обнаружено не было.

Однако при изучении этих же образцов в присутствии 8М мочевины (Рисунок 3) было показано, что практически во всех исследуемых образцах ИА не превышал 50%, что указывает на незавершенность созревания антител в большинстве случаев. Количество образцов с ИА $\geq 50\%$ составило всего 8,7%.

Детальное сравнение групп добровольцев с гибридным иммунитетом (группа III и IV) которые различались по году формирования иммунитета, количеству полученных вакцинных доз, показало следующие результаты. При использовании 4М мочевины медианное значение ИА для образцов за 2022 год составило 91,7% и не отличалось от медианного значения ИА за 2021 год, которое равнялось 90,5% (Рисунок 4А).

Однако при сравнении медианных значений ИА для образцов 2021 и 2022 годов с использованием 8М мочевины, оба значения оказались значительно ниже и составили 25% и 26% соответственно (Рисунок 4Б) и не различался между собой.



Примечание:

ns - нет достоверной разницы между подгруппами пациентов "2021" и "2022" с гибридным иммунитетом (непараметрический критерий Манна-Уитни)

Рисунок 4 – Оценка индекса avidности при использовании (А) 4М и (Б) 8М мочевины в группах добровольцев с гибридным иммунитетом (группа III и IV), различающихся годом формирования иммунитета и количеству полученных вакцинных доз

Таким образом, данные результаты указывают, что в случае с вирусом SARS-CoV-2 процесс созревания антител остается не завершенным, независимо от времени, прошедшего после инфицирования или вакцинации, а также от их кратности, что в последствии может приводить к реинфекции.

Разработка, валидация и апробация метода определения нейтрализующих антител, специфически блокирующих взаимодействие между RBD и ACE2

Эталоном для определения вируснейтрализующих антител является классическая реакция нейтрализации (РН) вируса в чувствительной для него культуре клеток. Однако, из-за обращения с живым SARS-CoV-2, для проведения такого анализа требуются специальные условия биобезопасности, помимо этого, анализ трудоемок, на его выполнение уходит 2-4 дня. Поэтому задачей следующего этапа исследования было создание более простой, а главное безопасной альтернативы РН - суррогатного вируснейтрализующего теста (sVNT) - серологического иммуноферментного анализа, определяющего только антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2.

Механизм sVNT основан на моделировании ключевого этапа инфицирования - взаимодействия рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2. Специфические антитела к вирусному белку могут блокировать это взаимодействие, тем самым предотвращая связывание конъюгированного RBD с рекомбинантным ACE2, иммобилизованным на поверхности планшета.

Был разработан sVNT тест, результаты которого выражались в виде коэффициент подавления (КП%). КП прямо пропорционален концентрации антител, блокирующих образование комплекса между RBD и ACE2: чем больше КП для образца, тем больше в нем соответствующих антител. Пороговое значение и диагностические характеристики sVNT определялись с помощью ROC-анализа. Результаты ROC-анализа для выборок образцов, полученных на разных этапах пандемии, представлены на Рисунке 5.

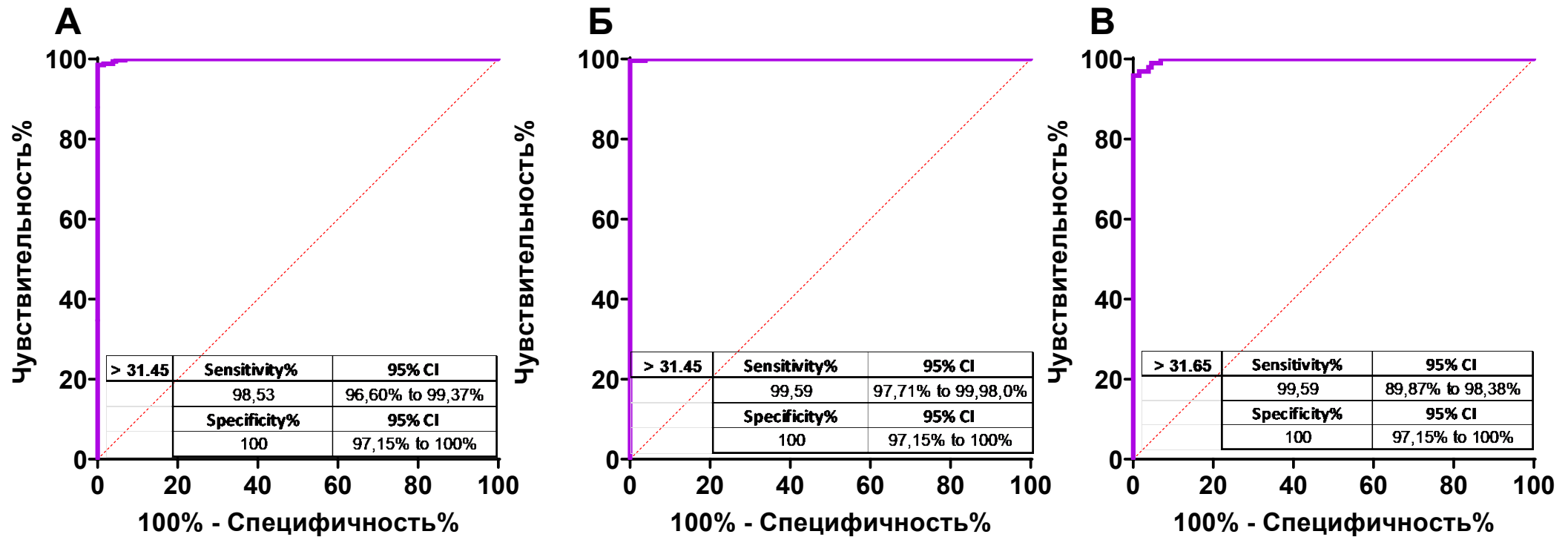
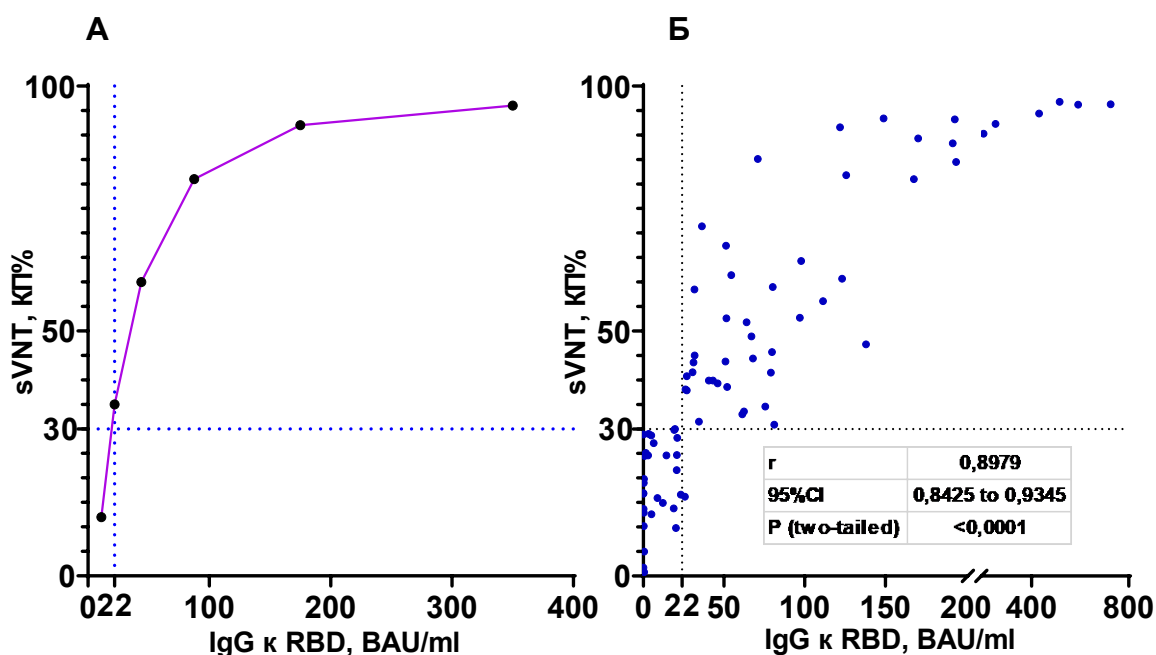


Рисунок 5 – Кривые ROC результатов sVNT: **А** - для положительных образцов (гибридный иммунитет и постинфекционный) полученных в 2020-2021 г., **Б** - для положительных образцов (постинфекционный иммунитет) полученных в 2020 г., **В** - для положительных образцов (гибридный иммунитет), полученных в 2021 г.; Образцы, полученные с 2017 по 2019 гг. использовали в качестве не содержащих антител

Оценка аналитической чувствительности sVNT осуществлялась по международному стандартному образцу First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, human (NIBSC code: 20/136). Определена концентрация антител к SARS-CoV-2, блокирующая взаимодействие RBD и ACE2, соответствующая КП = 30%. На основании трех независимых экспериментов диапазон чувствительности был в пределах 20-22 BAU/мл (Рисунок 6А).



Примечание: На каждом графике приведена граница уровня отсечения (КП=30, ось Y) и граница чувствительности (BAU/ml= 22 ось X).

Рисунок 6 – (А) Кривая титрования стандарта ВОЗ в sVNT; (Б) Результаты зависимости КП от количества антител, полученных в наборах сравнения

Аналитическая чувствительность, определенная по стандартному образцу ВОЗ, не противоречила экспериментальным данным, полученным при исследовании образцов сывороток крови в наборах двух производителей - «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» («МедипалТех», Россия) и «SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit» («Abbott», Ирландия), коэффициент корреляции Спирмена ($r = 0,8979$, ДИ 95%:0,8425-0,9345, $p < 0,0001$) свидетельствует о выраженной, статистически значимой корреляции между КП% sVNT и количеством антител, выявленных в наборах сравнения (Рисунок 6Б).

Сопоставление данных, полученных в sVNT, с титром нейтрализующих антител, полученном в классической реакции нейтрализации вируса

Было проведено сопоставление полученных значений КП с полученными в РН титрами ВНА в группе добровольцев с постинфекционным иммунитетом, результаты которого представлены на Рисунке 7А. Коэффициент корреляции Спирмена для этих данных составил 0,8187 (ДИ 95%:0,7641-0,8616, $p < 0,0001$), и, таким образом, полученные данные говорят о выраженной, статистически значимой корреляции КП% sVNT с титрами ВНА, определенными в вирусологической РН.

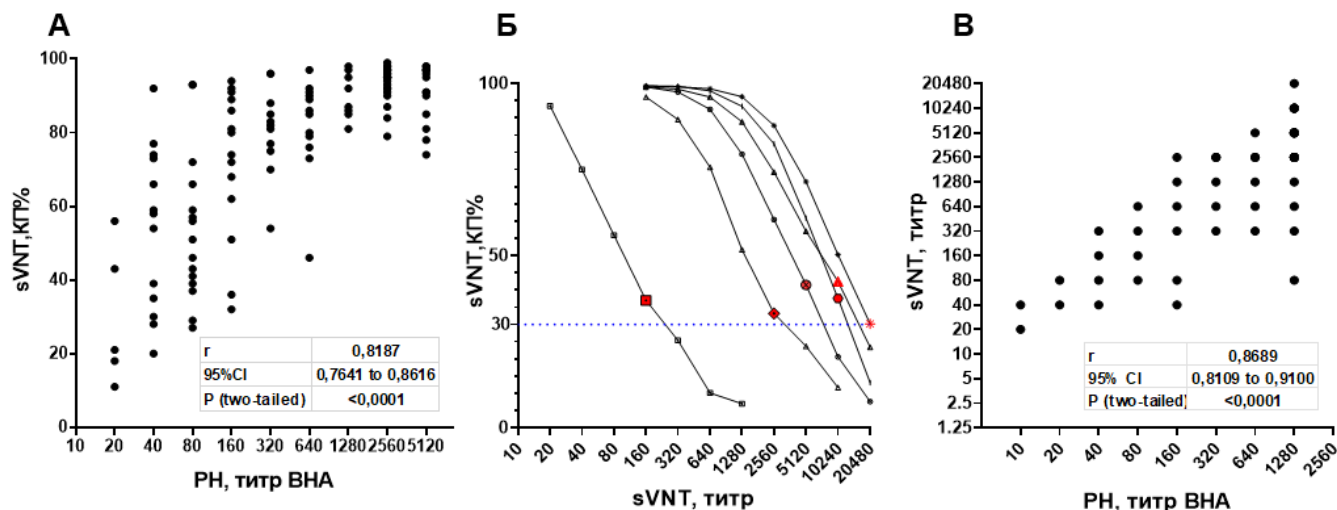


Рисунок 7 – Сопоставление полученных значений в sVNT (КП) с полученными в РН титрами ВНА. **А.** Зависимость коэффициента подавления КП% (ось Y) от титра ВНА (NT50, ось X); **Б.** Кривые титрования образцов; **В.** Зависимость титра sVNT (ось Y) от титра ВНА в РН (ось X)

В процессе анализа данных дополнительно использовался уточненный параметр, характеризующий содержание антител – sVNT титр, который соответствовал последнему разведению исследуемого образца при КП>30%. В группе добровольцев с гибридным иммунитетом, sVNT титр определялся по кривым титрования образцов, анализируемых в ряде последовательных разведений. Пример таких кривых титрования представлен на Рисунке 7Б. При сравнении титров ВНА РН с титрами sVNT (Рисунок 7В) установлена корреляция высокой степени, коэффициент Спирмена составил 0,8689 (ДИ 95%:0,8109 -0,9100, p <0,0001).

Сопоставление результатов уровня высокоавидных IgG с sVNT-титром и титром ВНА, полученных в sVNT и в РН к SARS-CoV-2 в группе вакцинированных добровольцев

Чем выше avidность антител, способных блокировать взаимодействие RBD с ACE2, тем лучше их нейтрализующая способность.

При оценке степени корреляции индекс avidности IgG (ИА) продемонстрировал слабую, хотя все еще статистически достоверную корреляцию с титром ВНА (Рисунок 8А).

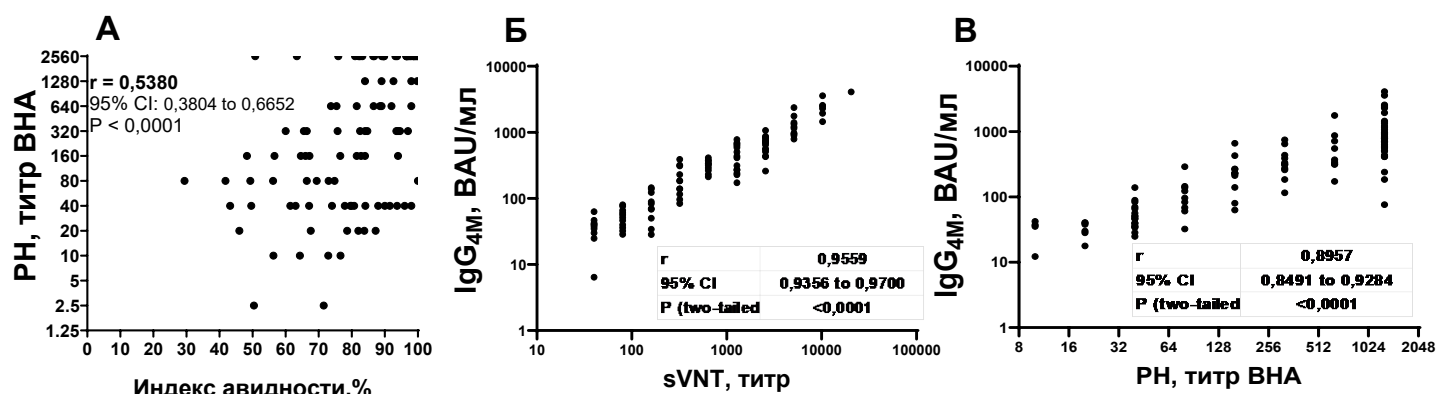


Рисунок 8 – Сопоставление результатов, полученных двумя методами. **А.** Корреляция ИА (%) IgG (ось X) с титром ВНА, полученным в РН (ось Y); **Б.** Корреляция уровня высокоавидных IgG (ось Y) с sVNT-титром (ось X) и **В.** Корреляция уровня высокоавидных IgG (ось Y) с титром ВНА, полученным в РН (ось X)

Этот результат был предсказуем, поскольку индекс avidности не отражает количество или концентрацию антител (в отличие от титра ВНА или ВАУ/мл). Вместо этого он характеризует

долю IgG-антител, способных оставаться связанными с RBD в присутствии денатурирующего агента, среди общего пула специфических IgG. Тем не менее, можно рассчитать концентрацию высокоаффинной фракции IgG которая, как предполагается, обеспечивает основной эффект нейтрализации вируса. Таким образом, имеет смысл искать корреляцию между этим показателем IgG_{4м} с титром ВНА и титром sVNT. Коэффициенты корреляции, рассчитанные с использованием критерия Спирмена (r), составили 0,9559 (Рисунок 8Б) и 0,8957 (Рисунок 8В), соответственно; это показывает сильную и статистически значимую связь между рассчитанным показателем уровня высокоавидных антител IgG (BAU/мл) с титрами sVNT и титрами ВНА(PH) в исследуемой группе пациентов. Было установлено, что в группах добровольцев с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетом у 9,3%, 5,7% и 7,3%, соответственно, отсутствовали вируснейтрализующие антитела.

Оценка корреляции суррогатного вируснейтрализующего теста с реакцией нейтрализации на стадии доклинических испытаний вакцинного препарата против коронавируса

В рамках настоящего раздела исследования было проведено сравнительное изучение результатов, полученных при помощи классического метода PH, с методом sVNT в отношении сывороток крови трех видов животных - трансгенных мышей, коров и собак на этапе доклинических испытаний экспериментального вакцинного препарата против SARS-CoV-2, в составе которого содержался белок Spike SARS-CoV-2. Анализ данных, представленных на Рисунке 9, выявил статистически достоверную взаимосвязь между показателям КП, и титрами ВНА, полученными в ходе вирусологической PH в исследуемых группах.

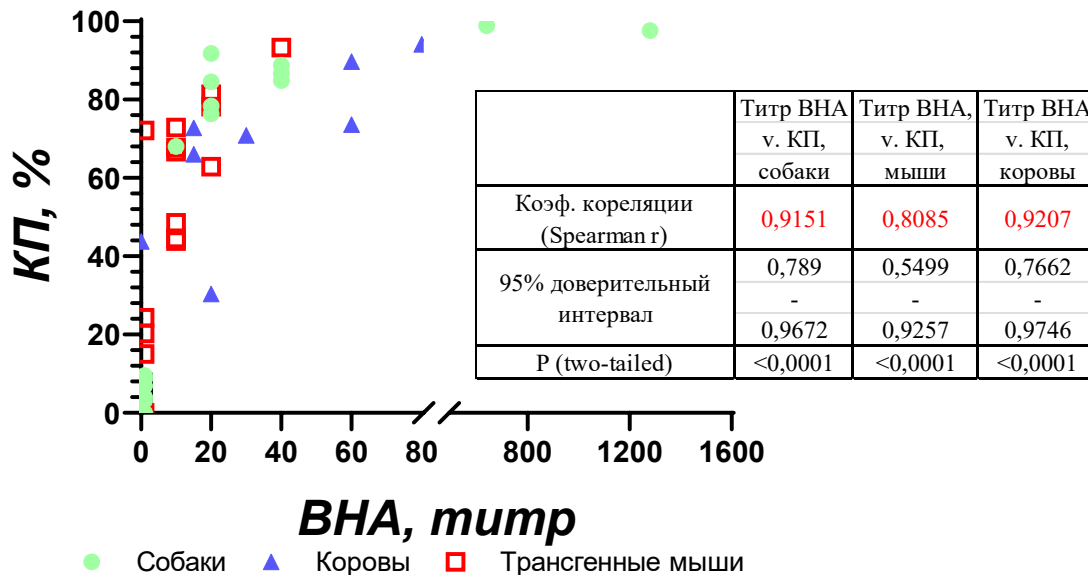


Рисунок 9 – Корреляция между результатами sVNT (выражены в КП, %, ось Y) и титром ВНА, полученным в PH (ось X)

Диапазон коэффициента корреляции Спирмена между коэффициентом подавления sVNT теста и титром ВНА, полученным в PH, для трех видов животных был в пределах 0,8085-0,9207 (Рисунок 9). Данные, полученные для образцов трех видов животных (трансгенных мышей, собак и коров), хорошо соотносятся с аналогичными, полученными для сывороток крови людей и демонстрирующими высокую корреляцию между результатами sVNT-подобных конкурентных тестов для определения антител, блокирующих образование комплекса RBD и

ACE2, с результатами определения ВНА в вирусологической РН.

Таким образом, был разработан тест, который позволяет выявлять антитела, блокирующие взаимодействие RBD-ACE2, простым, безопасным и быстрым способом с высокой специфичностью и чувствительностью.

Разработка, валидация и апробация метода определения Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2

Задачей данного этапа работы было создание тест системы, основанной на способности Т-клеток иммунных к SARS-CoV-2 людей продуцировать IFN- γ (ИГПА-тест), который является одним из маркеров Т-клеточного иммунитета, в ответ на стимуляцию пептидным пулом в цельной крови. Принцип метода представлен на Рисунке 10.

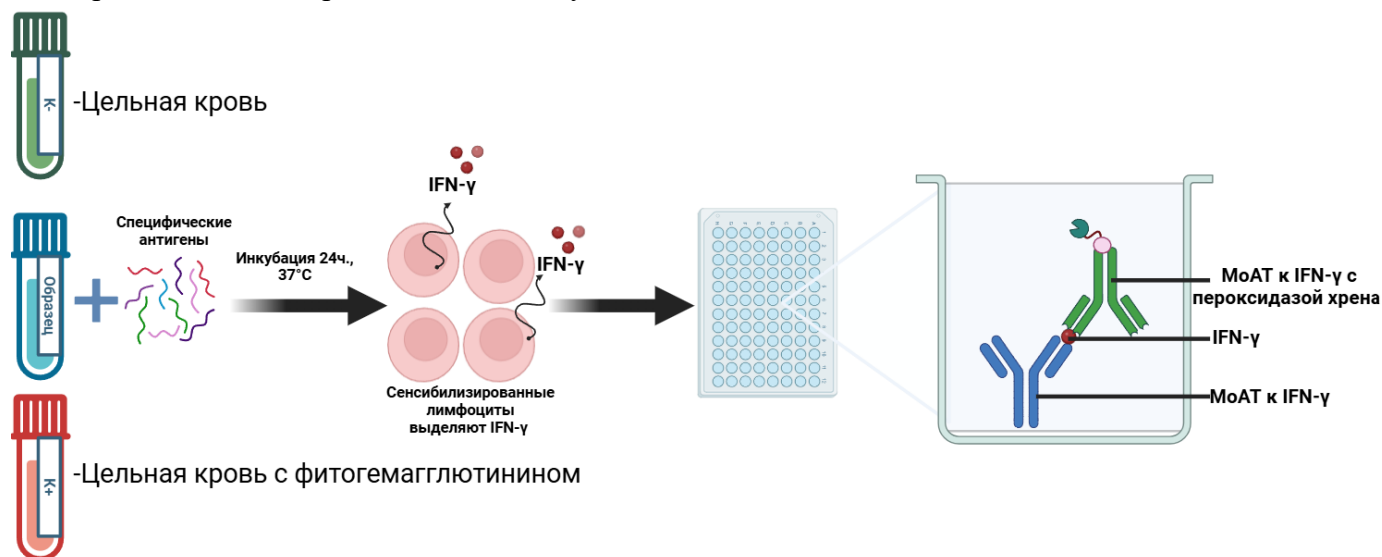
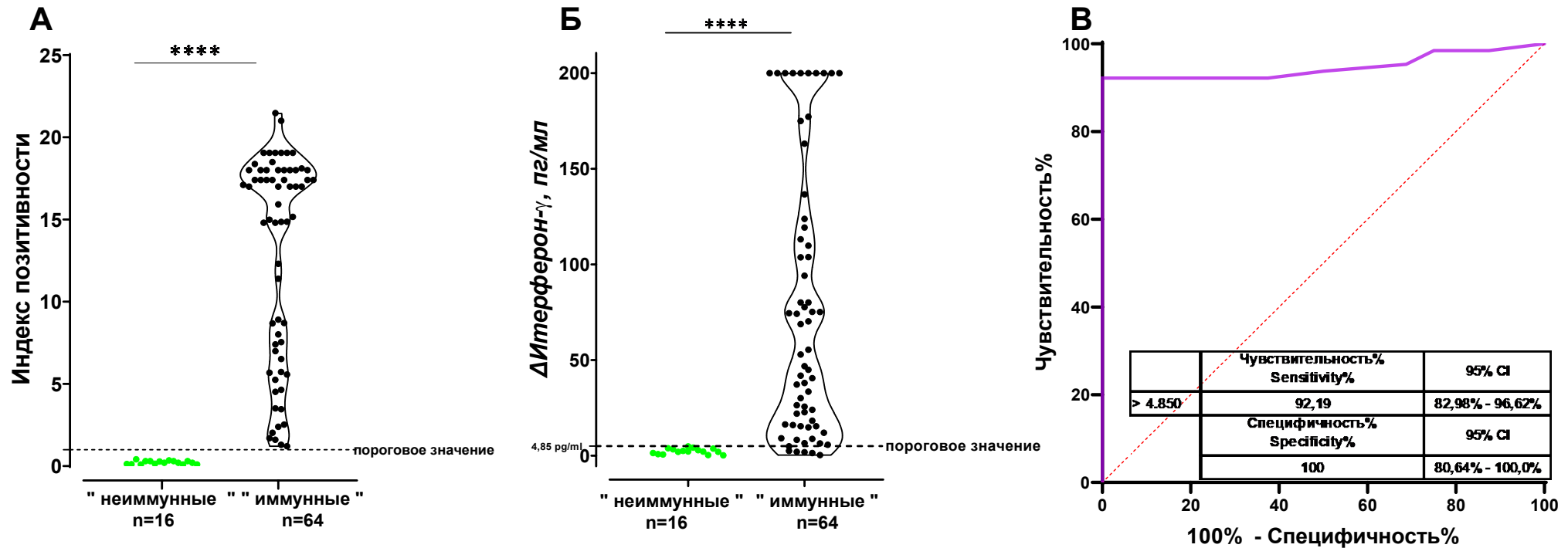


Рисунок 10 – Схема постановки метода определения Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2

Первый этап работы был посвящен определению уровня IFN- γ , секретируемого в ответ на антигенную стимуляцию лимфоцитов крови, который мог быть ассоциирован с наличием или отсутствием предшествующей иммунизации пациента против SARS-CoV-2. С этой целью исследовали образцы от 80 участников с известным медицинским анамнезом (наличие или отсутствие вакцинации, заболевание COVID-19), собранные в период 2021 года, когда еще сохранялась неиммунная прослойка населения. Для всех них определяли антитела класса G к RBD SARS-CoV-2, а также изменение уровня IFN- γ (Рисунок 11А, Б) в плазме крови после стимуляции лимфоцитов.

Пороговое значение, определяющее достоверно значимое превышение уровня IFN- γ после стимуляции над исходным уровнем, определяли как Δ IFN- γ (Δ IFN- γ = IFN- γ образца после стимуляции – IFN- γ образца до стимуляции), для которого сумма чувствительности и специфичности (т.е. процентной согласованности выраженности интерферонового ответа к иммунному статусу в анамнезе) была максимальной. Эта величина составила 4,85 пг/мл (Рисунок 11В), диагностические характеристики разработанного ИГПА-теста в части определения иммунитета к SARS-CoV-2 составили: – диагностическая специфичность – 100% (80,6-100%; ДИ 95%)– диагностическая чувствительность – 92,19% (82,3-96,6%; ДИ 95%).



Примечание:

****- достоверная разница в медианных значениях между подгруппами "иммунных" и "неиммунных" (непараметрический критерий Манна-Уитни, $p < 0,001$).

Рисунок 11 – (А) Уровень антител IgG (в относительных единицах ИП) в сыворотке крови пациентов с наличием ($n=64$, черные точки) или отсутствием ($n=16$, зеленые точки) гуморального иммунитета к SARS-CoV-2. (Б) Превышение уровня IFN- γ над базовым (в пг/мл, шкала по оси Y) у тех же пациентов. (В) Кривая ROC результатов ИГРА-теста для «иммунных» в сравнении с «неиммунными» донорами

Оценка Т-клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2 при помощи ИГРА-теста на выборке добровольцев с гибридным иммунитетом

На втором этапе работы по изучению клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 было проведено исследование выборки из 258 добровольцев, образцы цельной крови которых были получены в сентябре – октябре 2022 года. Характеристика выборки пациентов представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Общая характеристики пациентов, исследованных на наличие Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2

Характеристика	Фактор	Общее	Вакцинация «Спутник V»	COVID-19 в анамнезе
Доноры	Количество	258	258 (100%)	198 (76,7%)
Возраст	Медиана возраста	43	43	43
	Диапазон (мин.-макс)	19-73	19-73	19-73
Пол	Муж.	70 (27,1%)	70 (27,1%)	48 (24,2%)
	Жен.	188 (72,9%)	188 (72,9%)	150 (75,8%)

Для всех пациентов определялся уровень антител класса G к RBD SARS-CoV-2 и уровень IFN- γ продуцируемого в ответ на стимуляцию лимфоцитов антигенами SARS-CoV-2. Результаты представлены на Рисунке 12А,Б.

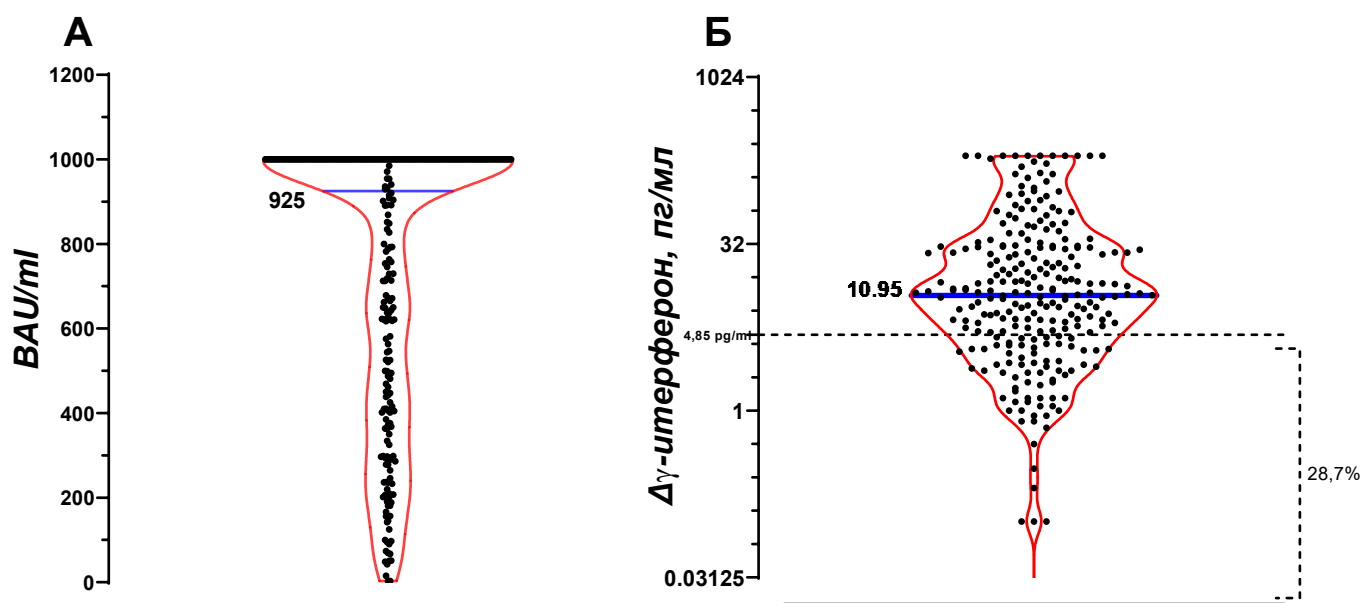
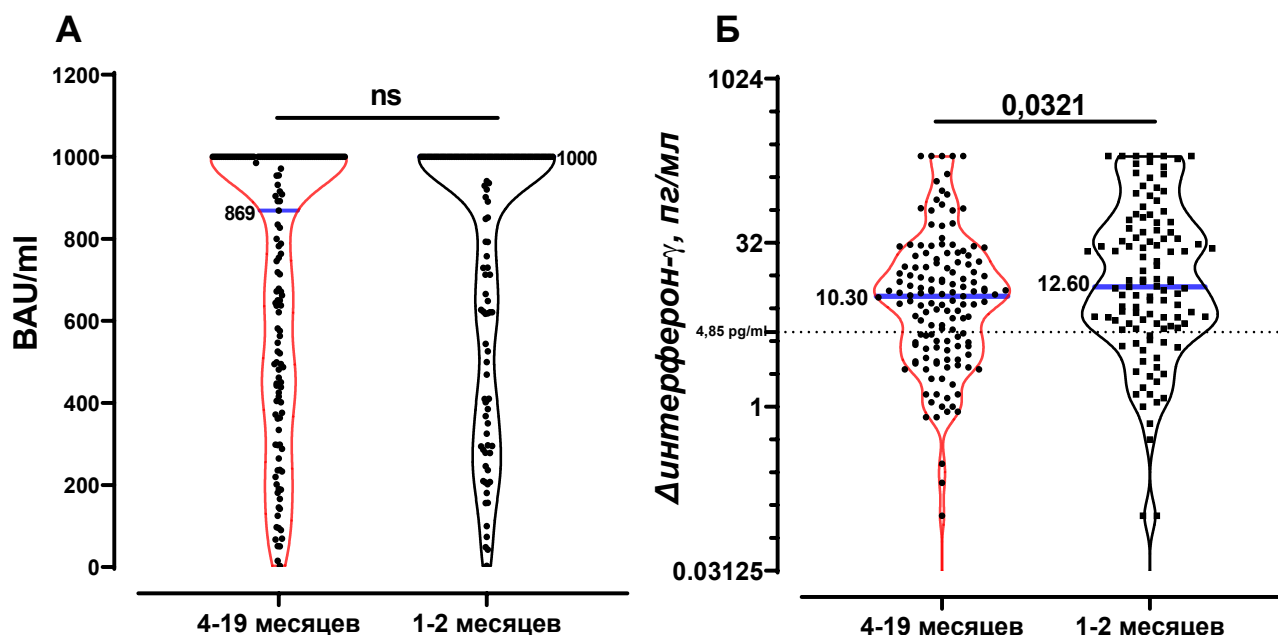


Рисунок 12 – Оценка адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2: А. Уровень антител IgG в сыворотке крови (BAU/мл). Б. Превышение уровня IFN- γ над базовым уровнем (4,85 пг/мл) в ИГРА-тесте

Во всех образцах были выявлены антитела класса G к RBD SARS-CoV-2. По результатам ИГРА-теста у 28,7% пациентов с гибридным (вакцина плюс перенесенное заболевание) или поствакцинальным иммунитетом значимого (более 4,85 пг/мл) превышения уровня IFN- γ после стимуляции выявлено не было. По результатам проведенного статистического анализа (критерий Спирмена $r = -0,03021$, ДИ: $-0,2957-0,2396$, $p=0,8235$) корреляции между уровнем антител и уровнем продуцируемого IFN- γ во всей группе выявлено не было.

Сравнение уровня антител IgG к RBD SARS-CoV-2 и IFN- γ в группах, отличающихся временем, прошедшим от последней вакцинации, представлены на Рисунке 13. В зависимости от времени, прошедшего после последней вакцинации, все пациенты были разделены на две группы: первая группа включала образцы цельной крови пациентов, прошедших ревакцинацию за 1–2 месяца до взятия крови, вторая — пациентов, вакцинированных за 4 и более.



Примечание:

ns - нет достоверной разницы (непараметрический критерий Манна-Уитни)

Рисунок 13 – Оценка адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2 в зависимости от времени, прошедшего после последней вакцинации до взятия крови. **(А)** Уровень антител IgG и их медианное значение. **(Б)** Превышение уровня IFN- γ над базовым уровнем и их медианное значение (по оси Y шкала логарифмическая)

Медианные значения обоих параметров незначительно выше у добровольцев, прошедшей ревакцинацию за 1-2 месяца до проведения исследования, при этом достоверная разницы между двумя выборками была выявлена только при оценке Δ IFN- γ , пг/мл (критерий Манна-Уитни, $p=0,0321$).

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и апробированы наборы реагентов для определения IgG антител к RBD SARS-CoV-2 и их авидности. Чувствительность составила - 99% (ДИ: 86,28-100%, $p<0,05$) специфичность - 100%(ДИ:92,89-100%, $p<0,05$).

2. Установлено, что только у 8,8% вакцинированных и перенесших COVID-19 добровольцев наблюдалось образование аффинно-зрелых IgG-антител к RBD SARS-CoV-2.

3. Показано, что у лиц, перенесших COVID-19 в 2020 году (в период наибольшего распространения варианта «Ухань» SARS-CoV-2), а затем реинфицированных в 2021 году (в период циркуляции штамма «Дельта»), ИА <50% (мягкий денатурирующий агент - 4М мочевины) служит маркером для оценки риска тяжелого течения заболевания при повторных инфекциях.

4. Разработана тест система - суррогатный вируснейтрализующий тест- для определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с ACE2 рецептором. Тест показал высокую чувствительность 96% (ДИ $\pm 3,35\%$, $p < 0,05$) и специфичность 100% (ДИ $\pm 0,65\%$, $p < 0,05$).

5. Была установлена высокая степень корреляции между показателем КП%/sVNT-титра с титрами ВНА для добровольцев с постинфекционным ($r = 0,8187$, $p < 0,0001$), поствакцинальным ($r = 0,8539$, $p < 0,0001$) и гибридным ($r = 0,8689$, $p < 0,001$) иммунитетом, а также для животных: собак ($r = 0,9151$, $p < 0,0001$), трансгенных мышей ($r = 0,8085$, $p < 0,0001$) и коров ($r = 0,9207$, $p < 0,0001$). В группах добровольцев с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетами у 9,3%, 5,7% и 7,3%, соответственно, отсутствовали вируснейтрализующие антитела.

6. Разработан и апробирован тест для определения Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2, основанный на измерении IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими пептидами антигенов коронавируса, с чувствительностью 92,2% (ДИ 95%: 83-96,6%) и специфичностью 100% (ДИ 95%: 80,6-100%).

7. Посредством измерения IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими пептидами антигенов SARS-CoV-2, выявлено, что у 71,3% добровольцев с гибридным иммунитетом наблюдалась специфическая Т-клеточная реакция.

8. Показано, что в группах добровольцев с гибридным иммунитетом к SARS-CoV-2 корреляции между уровнем антител и уровнем гамма интерферона, продуцируемого после стимуляции Т-лимфоцитов, не наблюдалось. При сравнении амплитуды превышение уровня IFN- γ над базовым уровнем у групп выборки, отличающихся временем последней вакцинации, медианные значения параметра были выше для части выборки, прошедшей ревакцинацию за 1-2 месяца ($p = 0,0321$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При изучении напряженности гуморального иммунитета, формируемого в результате перенесенной COVID-19 и/или иммунизации кандидатными вакцинными препаратами, методология теста для оценки индекса авидности антител класса G к RBD SARS-CoV-2 может быть использована для определения количества антител, обладающих наибольшей степенью авидности, которые имеют высокую степень корреляции с титрами вируснейтрализующих антител. Кроме того, данный тест может быть использован в клинической практике как прогностический фактор для оценки риска тяжести течения COVID-19 при реинфекциях.

2. Разработанный sVNT-тест, который позволяет выявлять антитела, блокирующие взаимодействие между RBD SARS-CoV-2 и ACE2, в сыворотке/плазме крови людей и различных видов животных, показал высокую степень корреляции с титрами вируснейтрализующих антител, полученными в классической реакции нейтрализации вируса. В связи с этим, данный тест может быть использован в процессе доклинических и клинических испытаний кандидатных вакцинных препаратов, для оценки формирования протективных антител, как аналог классической реакции нейтрализации.

3. Методом, основанным на измерении IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими антигенами SARS-CoV-2, может быть проведена как оценка формирования клеточно-опосредованного иммунитета к кандидатным вакцинным препаратам против коронавируса, так и оценка уровня популяционного клеточного иммунитета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2 / **Б.С. Черепович**, А.М. Кудряшова, Н.П. Карташова [и др.] // **Медицинская иммунология**. – 2024. – Т. 26. – № 3. – С.569-576. [Scopus]
2. Определение Т-клеточного иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2, основанного на индукции выработки γ -интерферона специфическими Т-лимфоцитами периферической крови при их стимуляции вирусным антигеном / **Б.С. Черепович**, А.М. Кудряшова, Л.Л. Панкратьева [и др.] // **Медицинская иммунология**. – 2025; Т. 27– №1: – С.45-56. [Scopus]
3. Разработка и оценка диагностических характеристик иммуноферментного метода определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARSCoV-2 и ACE2 / **Б.С. Черепович**, А.М. Кудряшова, В.А. Мануйлов [и др.] // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2025; Т. 70– №2: – С.119-125. [Scopus]
4. Simple ELISA Methods to Estimate Neutralizing Antibody Titers to SARS-CoV-2: IgG Quantification, the Avidity Index, and the Surrogate Virus Neutralization Test / V. Manuylov, I. Dolzhikova; A. Kudryashova, **B. Cherepovich** [et al.] // **Archives of Microbiology and Immunology** – 2022. – Vol. 6.– P. 213-220. [PubMed]
5. Avidity of IgG to SARS-CoV-2 RBD as a Prognostic Factor for the Severity of COVID-19 Reinfection / V. Manuylov, O. Burgasova., **B. Cherepovich** [et al.] // **Viruses**. – 2022. – Vol. 14(3) – P. 617. [Scopus, Web of Science]
6. Эффективность метода определения антител, блокирующих взаимодействие RBD-домена коронавируса SARS-COV-2 и ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) в твердофазном ИФА, для доклинических испытаний иммуногенности кандидатных вакцинных препаратов / **Б.С. Черепович**, А.М. Кудряшова, В.А. Мануйлов, О.В. Борисова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. Москва, 03–04 июня 2022 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", 2022. – С. 30.
7. Определения Т-клеточного иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2, основанного на индукции выработки гамма-интерферона специфическими Т-лимфоцитами периферической крови при их стимуляции вирусным антигеном / **Б.С. Черепович**, А.М. Кудряшова, В.А. Мануйлов, О.В. Борисова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. Москва, 20–21 апреля 2023 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", 2023. – С. 45.
8. Динамика матурации авидности IgG-антител к RBD SARS- CoV- 2 / **Б.С. Черепович**, А.М. Кудряшова, В.А. Мануйлов, О.В. Борисова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. Москва, 23–24 апреля 2024 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", 2024. – С. 47.
9. Дифференциальная диагностика иммунитета к SARS-CoV-2: нейтрализующие антитела, авидность, клеточный иммунитет / В.А. Мануйлов, А.М. Кудряшова, **Б.С. Черепович** [и др.] // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: Материалы VIII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием, 26–29 октября 2021 года. – Сочи: Издательство "Новация", 2021. – С. 124-125.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ACE2 – Ангиотензинпревращающий фермент 2 (Angiotensin-converting enzyme 2)

BAU/мл – единицы связывающих антител (Binding Antibody Units/мл)

COVID-19 – коронавирусная болезнь 2019 года (Corona Virus Disease 2019)

ELISpot – иммуноферментный клеточный анализ (Enzyme linked immuno spot)

IFN- γ – интерферон гамма (interferon gamma)

IgA – иммуноглобулин A (immunoglobulin A)

IgG – иммуноглобулин G (immunoglobulin G)

IgM – иммуноглобулин M (immunoglobulin M)

NC – нуклеокапсидный белок (nucleocapsid protein)

NIBSC – Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control)

RBD – рецептор-связывающий домен (Receptor-binding domain)

SARS-CoV-2 – второй коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

sVNT – суррогатный вируснейтрализующий тест (surrogate virus neutralization test)

Δ IFN- γ – в ИГРА-тесте, разница между концентрацией IFN- γ в плазме крови после антигенной стимуляции и без нее

ВНА – вируснейтрализующие антитела

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДИ – доверительный интервал

ИА – индекс avidности

ИГРА-тест – анализ, основанный на высвобождении гамма-интерферона (interferon gamma release assay)

ИП – индекс позитивности

ИФА – иммуноферментный анализ

КП – коэффициент подавления

ОП – оптическая плотность

РН – реакция нейтрализации

РУ – регистрационное удостоверение Росздравнадзора России